

凋亡抑制蛋白介导泛素化在恶性黑色素瘤发生发展过程中的作用

蔡桂月^{1,2}, 邹锐涛^{1,2}, 陈嵘祎^{2*} (1. 广东医科大学, 广东湛江 523023; 2. 南方医科大学皮肤病医院, 广东广州 510091)

摘要: 恶性黑色素瘤(MM)是一种起源于黑素细胞的恶性肿瘤,对放疗、化疗不敏感,具有高度侵袭性。泛素蛋白酶系统可调节相关蛋白对各种细胞内生理过程进行调控,泛素连接酶(E3)是泛素化过程中识别底物的特异性酶,在MM发生发展过程中起重要作用。凋亡抑制蛋白(IAPs)RING结构域表现E3活性,通过调控多种在MM发展中起重要作用的蛋白和信号通路参与MM的发生发展过程。该文综述了IAPs通过泛素蛋白酶系统在MM发生发展过程中作用机制。

关键词: 恶性黑色素瘤; 泛素化; 凋亡抑制蛋白

中图分类号: R739.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)04-0490-04

Role of inhibitor of apoptosis proteins-mediated ubiquitination in malignant melanoma

CAI Gui-yue^{1,2}, ZOU Rui-tao^{1,2}, CHEN Rong-yi^{2*} (1. Guangdong Medical University, Zhanjiang 523024, China; 2. Dermatology Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510091, China)

Abstract: Malignant melanoma (MM), a malignant melanocyte-derived tumor, is insensitive to radiochemotherapy and highly invasive. Ubiquitin proteasome system can modulate various intracellular physiological processes via regulating the associated proteins. Ubiquitin ligase (E3) is a specific substrate-recognizing enzyme during ubiquitination and plays an important role in the occurrence and development of MM. The RING domain of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) possesses E3 activity and participates in the development of MM through regulating various MM-associated proteins and signaling pathways. This paper reviews the mechanism of IAPs on occurrence and development of MM via ubiquitin proteasome system.

Key words: malignant melanoma; ubiquitination; inhibitor of apoptosis proteins

泛素是一个由76个氨基酸残基组成的多肽,具有高度保守性,可对蛋白质进行翻译后修饰,泛素修饰的蛋白质可被蛋白酶体识别并降解,从而改变其定位、影响其活性、促进或干扰蛋白质之间的相互作用^[1]。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)是一类存在于多种组织与细胞中具有抗凋亡活性的蛋白,与多种肿瘤的发生发展、化学耐药和预后等密切相关。在恶性黑色素瘤(MM)中,多种凋亡抑制蛋白家族表达上调,具有RING结构域的IAPs具有泛素连接酶(E3)活性,通过泛素化过程调节多种在MM发展中起重要作用的蛋白和信号通路参与MM的发

生、发展。本文对IAPs通过泛素蛋白酶体系统在MM发生发展过程的作用机制作一综述。

1 泛素化过程在MM发生发展过程中的作用

泛素化是一个调控蛋白质表达的多步骤可逆反应,作为一种蛋白质翻译后修饰,它在细胞周期、细胞凋亡与DNA损伤修复等多个胞内反应中发挥作用。异常的泛素化会使胞内生理过程的正常调节发生变化,从而广泛参与肿瘤的发生发展过程^[2]。

泛素化修饰需要泛素活化酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)依次发挥作用。E3的作用是在泛素化过程中识别底物进行泛素化,决定了泛素化特异性,在包括MM的多种肿瘤中均检测到E3的突变或者表达差异。有研究发现神经前体细胞表达发育下调蛋白4-1(Nedd4-1)基因在MM中高表达,将其敲除后,细胞内表达同源性磷酸酶-张力蛋白,磷酸化AKT表达水平下调,导致细胞凋亡增加,表明Nedd4-1在MM中可能起癌基因作用^[3]。同样,研究

基金项目: 广东省自然科学基金(No.2021A1515011218, No. 2020 A1515010281)

收稿日期: 2021-02-20; 修订日期: 2021-04-12

作者简介: 蔡桂月(1996-),女,在读硕士生

通信作者: 陈嵘祎(1977-),男,博士,主任医师, E-mail: rongyichen@163.com

者还发现 Nedd4L 基因和 Smad 泛素化调节因子 2 的表达也可能促进 MM 细胞的增殖^[4-5]。鼠双微体 2 (MDM2) 作为调节抑癌基因 p53 的泛素连接酶, 通过泛素化过程降解移入细胞质的 p53。在原发 MM 中, MDM2 表达水平与肿瘤体积及侵袭性呈正相关^[6], 且同时抑制 MDM2 和丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶表达, 可以抑制 MM 细胞增殖^[7]。MDMX 作为 MDM2 的同源类似物, 同样具有泛素化降解 p53 的作用, 可作为 MM 联合治疗的有潜力的靶点之一^[8]。最近有文献报道称 E3 酶 RING 也可以靶向 p53 使其降解^[1]。p27 为另一个重要的抑癌基因, SKP2 的上调通过泛素化降解 p27、p57、p21 等抑癌基因, 促进细胞生长。研究发现, 从黑色素细胞到色素痣再逐步发展成为转移性 MM 的过程中, SKP2 表达水平逐渐增加, 而 p27 水平逐渐降低, 沉默 SKP2 后, MM 细胞的增殖受到抑制^[9-10]。泛素化是一个多种酶共同完成的过程, 目前关于 E3 在 MM 发生发展过程中的作用研究快速发展, 但尚未有成熟的靶向药物报道。在 MM 发生发展过程中, 其他异常表达的抑癌基因和癌基因翻译的蛋白质是否也受泛素化过程调控, 需要进一步研究。

2 IAPs 的结构与功能

2.1 IAPs 的结构特征

IAPs 是一类在细胞内表达结构具有同源性的蛋白分子, 目前已发现的人 IAPs 家族蛋白包括 XIAP、cIAP-1、cIAP-2、ML-IAP、Survivin、NAIP、ILP-2 和 BRUCE。IAPs 结构特征表现为三个结构域: N 末端杆状病毒 IAP 重复子 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeats, BIR)、C 末端环指结构 (ring zine-finger, RING) 和 Caspase 募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD)。所有 IAPs 家族成员均含有 BIR 结构域, BIR 通过与活化 Caspase 的 N 端 IBM 结合, 在抑制细胞凋亡中发挥关键作用。某些 IAPs 分子 (如 c-IAP1、c-IAP2、XIAP、ML-IAP 和 ILP-2) C 端包含一个指环结构 RING, RING 具有 E3 活性, 含有 RING 结构域的 IAPs 分子可以通过泛素蛋白酶体系统使自身或靶蛋白泛素化降解^[11]。cIAP-1/2 含有 CARD 结构域, 此结构位于 BIR 与 RING 之间, 由 6 个 α 螺旋构成, 通过与其他包含此结构的蛋白分子形成寡聚体, 调节细胞凋亡。

2.2 IAPs 的抗凋亡机制

IAPs 分子主要通过与 Caspase 结合, 抑制其催化活性阻止细胞凋亡^[12], 但各 IAPs 家族成员分别介导不同信号通路发挥其抗凋亡功能。研究发现 XIAP 为

最强的 Caspase 抑制剂, 可直接抑制 Caspase-3/7/9, 阻止细胞凋亡, ML-IAP 分子 N 端的 BIR 和 cIAP-1/2 的 BIR2 结构域参与调节活化的 Caspase-3/7, cIAP-1/2 的 BIR3 与活化的 Caspase-8 结合, 阻止 Caspase 与底物结合, 抑制其催化活性^[13]。IAPs 亦可通过非 Caspase 蛋白依赖途径抵抗凋亡, 如 XIAP、NAIP 和 ML-IAP 可激活 TAK1/JNK1 信号通路以抵抗肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导的细胞凋亡, XIAP 还可通过活化 TNF- α 受体进而激活核因子 κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 调控抗凋亡基因表达^[14], cIAP-1/2 可与 TNF- α 受体相关因子 2 (TNF α receptor associated factor 2, TRAF2) 结合, 并且作为 E3 酶靶向受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein, RIP1) 通过 TAK1 (TGF- β activated kinase 1) 信号途径激活 NF- κ B 进而抑制细胞凋亡^[15]。

2.3 IAPs 在 MM 组织中的功能

IAPs 最初被认为只对细胞凋亡有抑制作用, 但随着研究的深入, 人们发现多种具有 RING 结构域的 IAPs (包括 XIAP、cIAP-1、cIAP-2、ML-IAP 和 ILP-2) 具有 E3 活性, 并且在细胞迁移、炎症反应和免疫应答等多方面发挥作用。

有研究者采用 cDNA 微阵列研究显示, 在 MM 组织中有多种 IAPs 家族成员的表达较黑色素细胞痣高, 包括 ML-IAP、cIAP-1、cIAP-2、XIAP 等^[16]。后续实验中, 该研究者又采用 HIC、CISH 和 RT-qPCR 检测 MM 和黑色素细胞痣组织中的 ML-IAP, 发现 ML-IAP 在恶性黑色素瘤中的阳性率 (47.6%~70.6%) 明显高于其在黑色素细胞痣中的阳性率 (21.4%~25.0%), 提示 ML-IAP 可能在 MM 发生发展中起重要作用, 但在原发和转移性 MM 之间, ML-IAP 阳性率无明显差异, 提示 ML-IAP 在 MM 的转移中作用较小^[17]。Mousavi-Shafaei 等^[18]用寡核苷酸 M706 下调 ML-IAP 蛋白在 MM 细胞中的表达, 发现肿瘤细胞对化疗敏感性增高。Ayachi 等^[19]证实 XIAP 在转移性黑色素瘤和侵袭性黑色素瘤细胞系中表达增高, 敲除 XIAP 基因后, MM 细胞的迁移和纤维连接蛋白层表面细胞边缘的局灶性粘连的形成显著减少。此外, 有研究显示, IAPs 家族成员 survivin 水平在 MM 组织中表达增高, 抑制 survivin 的表达可以使肿瘤细胞凋亡增加^[20]。Zhou 等^[21-22]分别研究了 ML-IAP 和 XIAP 作为免疫原性靶点在 MM 中的潜在作用, 发现 MM 患者对两者均有较高频率的免疫应答, 且细胞和体液免疫反应与良好的免疫治疗效果相关。有趣的是, 有研究者发现 XIAP、cIAP-1/2 和 ML-IAP 通过泛素化降解 CARF 蛋白激酶促进细胞凋亡,

抑制MM细胞的迁移和侵袭^[23]。两种截然相反的研究结果说明IAPs可能在MM发展的不同阶段调控不同的分子和信号通路或其自身也被不同分子调控,从而导致这种抑制凋亡或促进凋亡效应的差异性,进一步揭示IAPs在MM发生发展中起着举足轻重的作用。Rac1属RhoGTP酶家族,与MM的增殖、侵袭、恶性进展有关,与良性痣皮损比较MM病灶存在Rac1高表达,且恶性程度高的MM细胞系Rac1活性也明显增高^[24]。Oberoi-Khanuja等^[25]发现IAPs可以发挥E3酶活性靶向Rac1,使其通过泛素化过程被蛋白酶体降解。IAPs依赖自身的E3活性参与MM细胞凋亡、细胞迁移、炎症反应和免疫应答等生理过程,但其具体的信号通路和分子机制尚未明了,进一步阐明IAPs如何调控MM细胞的增殖、迁移和侵袭,从而影响MM的发生发展,对MM患者的治疗及预后至关重要。

3 以IAPs为靶点治疗MM

目前,MM的治疗包括手术治疗、放疗和化疗等传统方式以及近十年研究热点免疫治疗和靶向治疗,虽然治疗方式多样,但MM患者生存率仍未得到明显改善,因此,寻找安全有效的治疗靶点成为重要课题。

IAPs对MM进展的作用研究结果表明,它们可能是治疗干预MM的有价值的靶点。目前研究人员已开发出多种单价和二价IAPs拮抗剂,它们能诱导细胞凋亡和/或使癌细胞对其他凋亡诱导疗法敏感。这些抑制剂中大多数可以同时抑制多个IAPs家族成员,称为泛抑制剂,与之对应的特异性抑制单个IAPs的称为选择性抑制剂^[26-27]。研究表明选择性抑制剂对于诱导细胞凋亡的作用有限,提示各个IAPs家族成员之间可能具有协同作用^[28]。单独抑制survivin或ML-IAP在临床实验中均未取得良好疗效,但利用ML-IAP具有高度免疫原性的特点,用免疫疗法靶向ML-IAP阳性的肿瘤可以改善疗效^[29]。有研究小组发现使用单链反义寡核苷酸靶向XIAP,使之选择性被拮抗后可能具有一定抗肿瘤活性,然而同时抑制XIAP和cIAP可以获得更好的疗效^[30-31]。单独抑制IAPs可能是其他凋亡诱导方式的促进剂,Engesæter等^[32]用siRNA将XIAP敲低后,MM细胞对凋亡诱导剂TRAIL诱导凋亡的敏感性增强;Yuan等^[33]发现肿瘤靶向传递TNF α 和IAPs抑制剂LCL161联合运用可显著抑制黑素瘤异种移植小鼠的肿瘤生长和存活,并且比单独使用两者中任何一种药物都更有效。有趣的是,在对具有BRAF蛋白激酶突变的MM患者研究

中发现,IAPs抑制剂birinapant和TNF α 联合治疗在对BRAF抑制剂具有获得性耐药性的黑素瘤细胞中有效,表明IAP抑制剂对具有耐药性的患者可能有益^[34]。愈来愈多IAPs抑制剂进入了临床研究阶段,但对于黑素瘤有明显疗效且具有安全性的药物待进一步研究。我们已经阐述了IAPs可能在黑素瘤不同阶段发挥不同作用,希望能在不久的将来,科研工作者可以揭示出IAPs隐藏的奥秘,为黑素瘤患者带去福音。

4 小结

大量证据表明IAPs家族成员通过泛素化蛋白酶体系统调控相关蛋白和信号通路,在黑素瘤的发病机制中具有重要作用。通过研究黑素瘤中异常的IAPs表达及泛素化过程,有助于寻找遏制MM不断恶化的治疗靶点。此外,不管是削弱抑癌基因表达的蛋白质泛素化降解或是加强原癌基因表达的蛋白质泛素化降解都是肿瘤治疗中有潜力的研究方向,值得科研工作者进行深入探讨。

参考文献:

- [1] MANSOUR M A. Ubiquitination: Friend and foe in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 101: 80-93.
- [2] MORROW J K, LIN H K, SUN S C, et al. Targeting ubiquitination for cancer therapies [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(17): 2333-2350.
- [3] ARONCHIK I, KUNDU A, QUIRIT J G, et al. The antiproliferative response of indole-3-carbinol in human melanoma cells is triggered by an interaction with NEDD4-1 and disruption of wild-type PTEN degradation [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(11): 1621-1634.
- [4] KITO Y, BAI J, GOTO N, et al. Pathobiological properties of the ubiquitin ligase Nedd4L in melanoma [J]. *Int J Exp Pathol*, 2014, 95(1): 24-28.
- [5] SMITH M P, FERGUSON J, AROZARENA I, et al. Effect of SMURF2 targeting on susceptibility to MEK inhibitors in melanoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(1): 33-46.
- [6] RAJABI P, KARIMIAN P, HEIDARPOUR M. The relationship between MDM2 expression and tumor thickness and invasion in primary cutaneous malignant melanoma [J]. *J Res Med Sci*, 2012, 17(5): 452-455.
- [7] JI Z, NJAUW C N, TAYLOR M, et al. p53 rescue through HDM2 antagonism suppresses melanoma growth and potentiates MEK inhibition [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(2): 356-364.
- [8] GEMBARSKA A, LUCIANI F, FEDELE C, et al. MDM4 is a

- key therapeutic target in cutaneous melanoma [J]. *Nat Med*, 2012,18(8):1239-1247.
- [9] CHEN G, CHENG Y, ZHANG Z, et al. Cytoplasmic Skp2 expression is increased in human melanoma and correlated with patient survival[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):e17578.
- [10] ROSE A E, WANG G, HANNIFORD D, et al. Clinical relevance of SKP2 alterations in metastatic melanoma[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24(1):197-206.
- [11] KAMADA S. Inhibitor of apoptosis proteins as E3 ligases for ubiquitin and NEDD8[J]. *Biomol Concepts*, 2013, 4(2): 161-171.
- [12] MEHROTRA S, LANGUINO L R, RASKETT C M, et al. IAP regulation of metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(1):53-64.
- [13] LALAOUI N, VAUX D L. Recent advances in understanding inhibitor of apoptosis proteins[J]. *F1000Res*, 2018, 7:F1000 Faculty Rev-1889.
- [14] COSSU F, MILANI M, GRASSI S, et al. NF023 binding to XIAP-BIR1: searching drugs for regulation of the NF- κ B pathway[J]. *Proteins*, 2015, 83(4):612-620.
- [15] YU H, LIN L, ZHANG Z, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):209.
- [16] 龚静. 黑色素瘤中凋亡相关基因的 cDNA 微阵列研究与 ML-IAP 表达状况的检测[D]. 成都: 四川大学, 2005.
- [17] GONG J, CHEN N, ZHOU Q, et al. Melanoma inhibitor of apoptosis protein is expressed differentially in melanoma and melanocytic naevus, but similarly in primary and metastatic melanomas [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(10):1081-1085.
- [18] MOUSAVI-SHAFAEI P, ZIAEE A A, ZANGEMEISTER-WITTKE U. Increased cytotoxicity of cisplatin in SK-MEL 28 melanoma cells upon down-regulation of melanoma inhibitor of apoptosis protein [J]. *Iran Biomed J*, 2009, 13(1): 27-34.
- [19] AYACHI O, BARLIN M, BROXTERMANN P N, et al. The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is involved in melanoma invasion by regulating cell migration and survival [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019, 42(3):319-329.
- [20] GROSSMAN D, MCNIFF J M, LI F, et al. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 1999, 113(6):1076-1081.
- [21] ZHOU J, YUEN N K, ZHAN Q, et al. Immunity to the melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP; livin) in patients with malignant melanoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(5):655-665.
- [22] ZHOU J, LI J, GULERIA I, et al. Immunity to X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in malignant melanoma and check-point blockade[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(8):1331-1340.
- [23] DOGAN T, HARMS G S, HEKMAN M, et al. X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12):1447-1455.
- [24] DALTON L E, KAMARASHEV J, BARINAGA-REMENTERIA RAMIREZ I, et al. Constitutive RAC activation is not sufficient to initiate melanocyte neoplasia but accelerates malignant progression [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(6): 1572-1581.
- [25] OBEROI-KHANUJA T K, MURALI A, RAJALINGAM K. IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(9):e784.
- [26] ZHANG Y, SEIGAL B A, TERRETT N K, et al. Dimeric macrocyclic antagonists of inhibitor of apoptosis proteins for the treatment of cancer [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6(7): 770-775.
- [27] PEREZ H L, CHAUDHRY C, EMANUEL S L, et al. Discovery of potent heterodimeric antagonists of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) with sustained antitumor activity [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(3):1556-1562.
- [28] LU J, BAI L, SUN H, et al. SM-164: a novel, bivalent Smac mimetic that induces apoptosis and tumor regression by concurrent removal of the blockade of cIAP-1/2 and XIAP [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22):9384-9393.
- [29] LEWIS K D, SAMLOWSKI W, WARD J, et al. A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma [J]. *Invest New Drugs*, 2011, 29(1):161-166.
- [30] DEAN E, JODRELL D, CONNOLLY K, et al. Phase I trial of AEG35156 administered as a 7-day and 3-day continuous intravenous infusion in patients with advanced refractory cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(10):1660-1666.
- [31] NDUBAKU C, VARFOLOMEEV E, WANG L, et al. Antagonism of c-IAP and XIAP proteins is required for efficient induction of cell death by small-molecule IAP antagonists [J]. *ACS Chem Biol*, 2009, 4(7):557-566.
- [32] ENGESÆTER B O, SATHERMUGATHEVAN M, HELLENES T, et al. Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with dacarbazine or TRAIL in melanoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(1):47-58.
- [33] YUAN Z, SYRKIN G, ADEM A, et al. Blockade of inhibitors of apoptosis (IAPs) in combination with tumor-targeted delivery of tumor necrosis factor- α leads to synergistic antitumor activity [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(1):46-56.
- [34] KREPLER C, CHUNDURU S K, HALLORAN M B, et al. The novel SMAC mimetic birinapant exhibits potent activity against human melanoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(7):1784-1794.